

DIN EN 17915



ICS 11.080.20; 71.100.35

Einsprüche bis 2022-12-21

Entwurf

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitative Keimträgerprüfung zur Bestimmung der viruziden Wirkung
chemischer Desinfektionsmittel auf harten nicht-porösen Oberflächen in
den Bereichen Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche
Einrichtungen –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 2);
Deutsche und Englische Fassung prEN 17915:2022**

Chemical disinfectants and antiseptics –

Quantitative carrier test method for the evaluation of virucidal activity of chemical disinfectants on hard non-porous surfaces in food, industrial, domestic and institutional areas –

Test method and requirements (phase 2, step 2);

German and English version prEN 17915:2022

Antiseptiques et désinfectants chimiques –

Essai quantitatif de porte-germe pour l'évaluation de l'activité virucide des désinfectants chimiques utilisés sur les surfaces dures non poreuses dans le domaine de

l'agro-alimentaire, dans l'industrie, dans les domaines domestiques et en collectivité –

Méthode d'essai et prescriptions (Phase 2/Étape 2);

Version allemande et anglaise prEN 17915:2022

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2022-10-21 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), 10772 Berlin oder Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 73 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17915:2022) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-08-04 AA „Desinfektionsmittel Tierhaltung/Lebensmittelbereich“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitative Keimträgerprüfung zur Bestimmung der viruziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel auf harten nicht-porösen Oberflächen in den Bereichen Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche Einrichtungen – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 2)

Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative carrier test method for the evaluation of virucidal activity of chemical disinfectants on hard non-porous surfaces in food, industrial, domestic and institutional areas – Test method and requirements (phase 2, step 2)

Antiseptiques et désinfectants chimiques – Essai quantitatif de porte-germe pour l'évaluation de l'activité virucide des désinfectants chimiques utilisés sur les surfaces dures non poreuses dans le domaine de l'agro-alimentaire, dans l'industrie, dans les domaines domestiques et en collectivité – Méthode d'essai et prescriptions (Phase 2/Étape 2)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	8
4 Anforderungen an die viruzide Wirksamkeit auf Oberflächen	9
5 Prüfverfahren	10
5.1 Kurzbeschreibung	10
5.2 Materialien und Reagenzien, einschließlich Zellkulturen	10
5.2.1 Prüforganismen	10
5.2.2 Kulturmedien, Reagenzien und Zellkulturen	11
5.3 Apparate und Glasgeräte	14
5.3.1 Allgemeines	14
5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung	14
5.3.3 Prüfoberflächen	15
5.4 Herstellung der Prüforganismensuspensionen und der Produktprüflösungen	16
5.4.1 Prüforganismensuspensionen (Virusprüfsuspension)	16
5.4.2 Produktprüflösung	16
5.5 Verfahrensablauf zur Beurteilung der viruziden Wirkung des Produkts	17
5.5.1 Prüfbedingungen	17
5.5.2 Prüfverfahren	18
5.5.3 Durch Produktlösungen verursachte Zytotoxizität	20
5.5.4 Überprüfung der Wirksamkeit der Unterdrückung der viruzide Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln	21
5.5.5 Referenz-Virusinaktivierungsprüfung	21
5.5.6 Titration der Viruskontrollprobe	21
5.6 Versuchsergebnisse und Berechnung	22
5.6.1 Protokollierung der Ergebnisse	22
5.6.2 Berechnung des Infektiositätstiters (TCID ₅₀ – PFU)	22
5.7 Verifizierung des Verfahrens	22
5.8 Darstellung der Ergebnisse	23
5.8.1 Allgemeines	23
5.8.2 Berechnung der viruziden Wirksamkeit von in chemothermischen Prozessen verwendeten Produkten	23
5.8.3 Berechnung der viruziden Wirksamkeit von Produkten	23
5.8.4 Berechnung der begrenzten viruziden Wirksamkeit	24
5.9 Prüfbericht	24
Anhang A (normativ) Entgiftung von Prüfgemischen durch Molekularsiebfiltration	26
A.1 Molekularsiebfiltration mit Sephadex™ LH 20	26
A.1.1 Kurzbeschreibung	26
A.1.2 Sephadex-Suspension	26
A.1.3 Verfahren	26
A.2 Molekulares Sieben mit MicroSpin™ S 400 HR	28
A.3 Bestimmung des „Restvirus“-Titers mit der Large-Volume-Plating-Methode (LVP-Methode)	29
A.3.1 Allgemeines	29
A.3.2 Beispiel für die Berechnung von Titern und der Reduktion nach der Large-Volume-Plating-Methode	29
Anhang B (informativ) Berechnung des viralen Infektiositätstiters	31
B.1 Quantalversuche — Beispiel einer Bestimmung der TCID ₅₀ nach dem Spearman-Kärber-Verfahren	31

B.2	Plaqueversuch	31
B.3	Biometrische Bewertung von experimentellen Annäherungen und Beurteilung der desinfizierenden Wirkung auf den Virus (Reduktionsfaktor [R])	32
B.3.1	Allgemeines	32
B.3.2	Berechnung des Virustiters	32
B.3.3	Berechnung des Reduktionsfaktors	33
B.3.4	Praktische Beispiele	33
	Literaturhinweise	35

Bilder

Bild A.1 — Gerät zum molekularen Sieben mit Spritze	27
Bild A.2 — MicroSpin™ S 400 HR zur Reinigung von Virenproben	28

Tabellen

Tabelle 1 — Mindest- und zusätzliche Prüfbedingungen	9
Tabelle 2 — Geforderte chemische und physikalische Parameter	14
Tabelle 3 — Grenzen für Referenzsubstanzen	22
Tabelle B.1 — Beispiel von Titrationsergebnissen	31
Tabelle B.2 — a) Rohdaten für ein Beispiel von Titrationsergebnissen — Vorher (Virustiterkontrolle = a)	33
Tabelle B.3 — b) Rohdaten für ein Beispiel von Titrationsergebnissen — Nach Produktzugabe (Restvirus = b)	34

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17915:2022) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Einleitung

Dieses Dokument beschreibt ein Verfahren zur Oberflächenprüfung, mit dem festgestellt wird, ob ein Produkt, das als Desinfektionsmittel für die in Abschnitt 1 beschriebenen Bereiche vorgeschlagen wird, eine viruzide Wirksamkeit auf nicht poröse Oberfläche hat oder auch nicht.

Im Laboratoriumsversuch werden weitgehend die praktischen Anwendungsbedingungen simuliert. Die ausgewählten Bedingungen (Einwirkzeit, Temperatur, Organismen auf den Oberflächen usw.) spiegeln Parameter wider, die in praktischen Situationen vorkommen, einschließlich der Bedingungen, die möglicherweise die Wirkung von Desinfektionsmitteln beeinflussen. Jede durch diese Prüfung ermittelte Gebrauchskonzentration entspricht den festgelegten Versuchsbedingungen.

Die Bedingungen sind dafür vorgesehen, allgemeine Zwecke abzudecken und eine Referenz zwischen Laboratorien und Produkttypen ermöglichen. Jede durch diese Prüfung ermittelte Gebrauchskonzentration des chemischen Desinfektionsmittels oder Antiseptikums entspricht den festgelegten Versuchsbedingungen.

Für spezielle Anwendungen können die Empfehlungen zur Verwendung eines Produkts jedoch abweichen, so dass möglicherweise zusätzliche Prüfbedingungen erforderlich sind, die von dieser Europäischen Norm nicht abgedeckt werden können.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Prüfverfahren für und die Mindestanforderungen an die viruzide Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln fest, die bei Verdünnung mit Wasser standardisierter Härte bzw. bei gebrauchsfertigen Produkten mit Wasser als homogene, physikalisch stabile Zubereitung vorliegen.

Dieses Dokument gilt für Produkte, die in den Bereichen Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche Einrichtungen zur Desinfektion von nicht-porösen Oberflächen ohne mechanische Behandlung, mit Ausnahme von Bereichen und Bedingungen, wo eine Desinfektion aus medizinischen Gründen angezeigt ist.

Dieses Dokument gilt mindestens für den folgenden Anwendungsbereich:

a) Verarbeitung, Vertrieb und Verkauf von:

1) Lebensmitteln tierischer Herkunft:

- Milch und Milchprodukte;
- Fleisch und Fleischprodukte;
- Fisch, Meerestiere und daraus hergestellte Erzeugnisse;
- Eier und Eiprodukte;
- Tiernahrung;
- usw.;

2) Lebensmittel pflanzlicher Herkunft:

- Getränke;
- Früchte, Gemüse und daraus hergestellte Erzeugnisse (einschließlich Zucker, Destillationsprodukte usw.);
- Mehl, gemahlene und gebackene Produkte;
- Tiernahrung;
- usw.;

b) gewerbliche Einrichtungen und Haushaltsbereiche:

- Verpflegungseinrichtungen;
- öffentliche Bereiche;
- öffentliche Verkehrsmittel;
- Schulen;
- Kindergärten;
- Geschäfte;
- Sportstätten;

- Abfallbehälter (Mülltonnen usw.);
- Hotels;
- Wohngebäude;
- klinisch nicht relevante Bereiche von Krankenhäusern;
- Büroräume;
- usw.;

c) andere industrielle Bereiche als der Lebensmittelbereich:

- Verpackungsmaterial;
- Biotechnologie (Hefe, Proteine, Enzyme usw.);
- Hersteller von Pharmazeutika;
- Hersteller von Kosmetika und Toilettenartikeln;
- Hersteller von Textilien;
- Weltraumforschungsindustrie und Computerindustrie;
- usw.

EN 14885 legt im Einzelnen die Beziehung der verschiedenen Prüfungen untereinander sowie zu den „Anwendungsempfehlungen“ fest.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

EN 12353, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Aufbewahrung von Prüforganismen für die Prüfung der bakteriziden (einschließlich Legionella), mykobakteriziden, sporiziden, fungiziden und viruziden (einschließlich Bakteriophagen) Wirkung*

EN 14885, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Anwendung Europäischer Normen für chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika*

EN 10088-1, *Nichtrostende Stähle — Teil 1: Verzeichnis der nichtrostenden Stähle*

EN 10088-2, *Nichtrostende Stähle — Teil 2: Technische Lieferbedingungen für Blech und Band aus korrosionsbeständigen Stählen für allgemeine Verwendung*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach EN 14885 und die folgenden Begriffe.

3.1

Zytotoxizität

morphologische Veränderung von Zellen und/oder ihre Zerstörung oder die Reduktion ihrer Empfindlichkeit gegenüber einer Virusmultiplikation, die durch das Produkt verursacht wird

3.2

plaquebildende Einheiten

PFU, en: plaque forming units

Anzahl der infektiösen Viruspartikel je Volumeneinheit (ml)

3.3

Referenz-Virusinaktivierungsprüfung

Prüfung mit einem festgelegten Produkt (z. B. Glutaraldehyd) parallel mit einem zu prüfenden Produkt zur internen Kontrolle der Prüfung

3.4

TCID₅₀

50 %-Infektionsdosis einer Virussuspension oder der Verdünnung der Virussuspension, die in 50 % der Zellkultureinheiten eine virale zytopathische Wirkung (CPE) (3.5) auslöst

3.5

virale zytopathische Wirkung

CPE, en: viral cytopathic effect

morphologische Veränderung von Zellen und/oder ihre Zerstörung als Folge einer Virusmultiplikation

3.6

Virusplaque

Bereich der in einer Einschicht-Zellkultur unter einem halbfesten Medium aufgetretenen Zellauflösung (Lysis) durch die Infektion mit einem einzigen infektiösen Viruspartikel und dessen Vermehrung

3.7

Virustiter

Menge der in einem Zellkulturlysate oder in einer Lösung je Volumeneinheit vorhandenen infektiösen Viren

3.8

viruzide Wirksamkeit

Fähigkeit eines Produkts zur Verringerung der Anzahl infektiöser Viruspartikel des Adenovirus und des murinen Norovirus zur Oberflächendesinfektion in anderen Bereichen als der Lebensmittelverarbeitung, dem Vertrieb und dem Einzelhandel und des murinen Norovirus für Bereiche der Lebensmittelverarbeitung, des Vertriebs und des Einzelhandels

3.9

hohe viruzide Wirksamkeit

Fähigkeit eines Produkts, das in Gesundheitsbereichen und anderen professionellen Bereichen, in denen eine Desinfektion medizinisch angezeigt ist, zur Verringerung der Anzahl infektiöser Viruspartikel des murinen Parvovirus für die Flächendesinfektion in anderen Bereichen als dem öffentlichen Bereich, dem Bereich Haushalt, Lebensmittelverarbeitung, Vertrieb und Einzelhandel verwendet wird

3.10

begrenzte viruzide Wirksamkeit

Fähigkeit eines Produkts zur Verringerung der Anzahl infektiöser Viruspartikel des Vacciniavirus, wobei die Aktivität gegen alle umhüllten Viren abgedeckt ist

4 Anforderungen an die viruzide Wirksamkeit auf Oberflächen

Bei Prüfung in Übereinstimmung mit Tabelle 1 und Abschnitt 5, muss für das Produkt eine dezimal-logarithmische Reduktion (lg) um mindestens vier Stufen des Virustiters nachgewiesen werden.

Tabelle 1 — Mindest- und zusätzliche Prüfbedingungen

Mindestbedingungen	Oberflächendesinfektion in Industriebereichen, in Bereichen der Lebensmittelverarbeitung, des Vertriebs und des Einzelhandels	Oberflächendesinfektion in gewerblichen Einrichtungen und Haushaltsbereichen
Mindestspektrum von Prüforganismen	Viruzide Wirksamkeit für die biopharmazeutische Industrie <i>Murines Parvovirus</i> Viruzide Wirksamkeit für industrielle Bereiche außer der biopharmazeutischen und Lebensmittelindustrie <i>Adenovirus</i> <i>Murines Norovirus</i> Viruzide Wirksamkeit für die Lebensmittelindustrie <i>Murines Norovirus</i> Begrenzte viruzide Wirksamkeit <i>Vacciniavirus</i> Viruzide Wirksamkeit (chemothermisch) <i>Murines Parvovirus bei Temperaturen > 40 °C</i>	Viruzide Wirksamkeit für die Anwendung in gewerblichen Einrichtungen und im Haushalt <i>Adenovirus</i> <i>Murines Norovirus</i> Begrenzte viruzide Wirksamkeit <i>Vacciniavirus</i>
Prüftemperatur	zwischen 18 °C und 25 °C, aber für die chemothermische Behandlung	zwischen 18 °C und 25 °C
Zusätzliche Temperatur	zwischen 4 °C und ≤ 40 °C	zwischen 4 °C und ≤ 40 °C
Einwirkzeit	nach den Empfehlungen des Herstellers, aber nicht länger als 60 min ^c	nach den Empfehlungen des Herstellers, aber nicht länger als 60 min ^c
Belastungssubstanzen a) Bedingungen niedriger Belastung b) Bedingungen hoher Belastung	0,3 g/l Rinderserumalbumin und/oder 3,0 g/l Rinderserumalbumin	0,3 g/l Rinderserumalbumin und/oder 3,0 g/l Rinderserumalbumin
Zusätzliche Belastungen ^a	Weitere Einwirkzeit(en), Belastungssubstanz(en) oder Virus (Viren)	Weitere Einwirkzeit(en), Belastungssubstanz(en) oder Virus (Viren)
b Die Prüfung „viruzide Wirksamkeit gegen behüllte Viren (begrenzte Viruzidie)“ deckt nur alle behüllte Viren ab. d Adenovirus muss nur zur Oberflächendesinfektion in anderen Anwendungen als Lebensmittelverarbeitung, Vertrieb und Einzelhandel geprüft werden.		
^a Wenn geeignet (spezifische Zwecke), muss die zusätzliche spezifische viruzide Wirksamkeit unter anderen Zeit-, Temperatur- und Belastungssubstanzbedingungen (siehe 5.2.2.8) nach 5.5 bestimmt werden, um die beabsichtigten spezifischen Anwendungsbedingungen zu berücksichtigen. Falls zutreffend, können zusätzliche Viren geprüft werden. Die Konzentrationen, die sich als Ergebnis der Prüfungen unter zusätzlichen Belastungen ergeben, können niedriger sein, als die, die unter den Mindestprüfbedingungen gewonnen wurden.		
^c Die in dieser Tabelle angegebenen Einwirkzeiten für Flächendesinfektionsmittel werden auf der Grundlage der praktischen Bedingungen des Produkts ausgewählt. Die empfohlene Einwirkzeit für die Verwendung des Produkts liegt in der Verantwortung des Herstellers.		

Die bestimmte viruzide Konzentration des Prüfprodukts wird als geeignet für praktische Anwendungssituationen empfohlen.

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

5.1.1 Eine Prüfsuspension von Viren in einer Lösung von Belastungssubstanzen wird auf eine Prüfoberfläche inokuliert und getrocknet. Eine hergestellte Probe des zu prüfenden Produkts wird so aufgetragen, dass sie den getrockneten Film bedeckt.

Die Prüfoberfläche wird für eine festgelegte Zeit bei einer bestimmten Temperatur gehalten. Die Prüfoberfläche wird in ein Zellerhaltungsmedium überführt, damit die Wirkung des Desinfektionsmittels sofort neutralisiert wird. Der Titer des von der Prüfoberfläche gewonnenen Virus wird bestimmt.

Der Titer des Inokulums auf einer Prüfoberfläche, die statt des Desinfektionsmittels mit Wasser mit standardisierter Härte behandelt wurde, wird auch bestimmt, und die dem Produkt zugeschriebene Reduktion des Virustiters wird aus der Differenz berechnet.

5.1.2 Die Prüfung wird unter Verwendung der in Abschnitt 4, Tabelle 1 angegebenen Prüforganismen durchgeführt.

5.1.3 Andere Einwirkzeiten und Temperaturen können innerhalb bestimmter in Abschnitt 4, Tabelle 1 festgelegter Grenzen verwendet werden. Zusätzliche Belastungssubstanzen und Prüforganismen dürfen verwendet werden.

5.2 Materialien und Reagenzien, einschließlich Zellkulturen

5.2.1 Prüforganismen

Die viruzide Wirkung muss unter Verwendung des folgenden als Prüforganismus ausgewählten Stammes nach Abschnitt 4, Tabelle 1¹ bewertet werden:

a) Hüllenloses RNA-Virus²

Murines Norovirus, Stamm S99 Berlin

b) Hüllenloses DNA-Virus

1) *Adenovirus* Typ 5, Stamm Adenoid 75, ATCC VR-5

2) *Murines Parvovirus*, Minute Virus of Mice (MVM), Stamm Crawford, ATCC VR-1346

c) Behüllter DNA-Virus

Modifizierter Vacciniavirus, Stamm Ankara (MVA), ATCC VR-1508

Die geforderte Bebrütungstemperatur für den Prüforganismus beträgt $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ oder $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ (5.3.2.12). Die gleiche Temperatur (entweder 36°C oder 37°C) muss für alle Bebrütungen während einer Prüfung und deren Kontrolle und Validierung angewendet werden.

1 Die ATCC-Nummern sind die Sammlungsnummern von Stämmen, die von diesen Kultursammlungen geliefert werden. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

2 Das Murine Norovirus kann vom Friedrich-Loeffler-Institut „Bundesforschungsinstitut“ für Tiergesundheit, Hauptsitz Insel Riems Südufer 10, 17493, Greifswald-Insel Riems (Tel.: +49 38351 7-0, Fax: +49 038351 7-121 bezogen werden. <http://www.fli.bund.de>.

Wenn zusätzliche Prüfororganismen verwendet werden, müssen sie unter den im Prüfbericht anzugebenden optimalen Wachstumsbedingungen (Temperatur, Dauer, Atmosphäre, Medien) aufbewahrt und verwendet werden. Wenn diese zusätzlichen Prüfororganismen nicht in einem Referenzzentrum klassifiziert wurden, müssen ihre Identifizierungsmerkmale angegeben werden. Darüber hinaus müssen sie von dem Prüflaboratorium oder der nationalen Kultursammlung für fünf Jahre als Referenzprobe zurückgestellt werden.

5.2.2 Kulturmedien, Reagenzien und Zellkulturen

5.2.2.1 Allgemeines

Alle in dieser Europäischen Norm angegebenen Massen chemischer Substanzen beziehen sich auf wasserfreie Salze. Hydratisierte Formen dürfen als Alternative verwendet werden, aber die erforderlichen Massen müssen angepasst werden, um daraus folgende Differenzen in den relativen Molekülmassen zu berücksichtigen.

Die Reagenzien müssen analysenrein und/oder für mikrobiologische Zwecke geeignet sein. Sie müssen frei von Substanzen sein, die toxisch oder hemmend auf die Prüfororganismen wirken.

Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit wird empfohlen, dass zur Herstellung von Kulturmedien handelsüblich erhältliche Materialien verwendet werden, wenn sie geeignet sind. Die Anweisungen des Herstellers zur Verarbeitung dieser Erzeugnisse sollten strengstens befolgt werden.

Für jedes Kulturmedium und Reagenz sollte eine zeitliche Begrenzung der Verwendung festgelegt werden.

Alle festgelegten pH-Werte werden bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ gemessen.

5.2.2.2 Wasser

Das Wasser muss frisch in einer Glasapparatur destilliertes und darf nicht entmineralisiertes Wasser sein. Falls kein destilliertes Wasser geeigneter Qualität zur Verfügung steht, darf Wasser für Injektionszwecke (siehe Literaturhinweis [1]) verwendet werden.

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)]. Die Sterilisation ist nicht erforderlich, falls das Wasser z. B. für die Herstellung von Kulturmedien verwendet und anschließend sterilisiert wird.

Hinsichtlich des Verfahrens zur Herstellung von Wasser standardisierter Härte siehe 5.2.2.7.

5.2.2.3 Phosphatpuffer-Kochsalz-Lösung (PBS)

Natriumchlorid (NaCl)	8,00 g
Kaliumchlorid (KCl)	0,20 g
Dinatriumhydrogenphosphat, 12-fach verdünnt ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$)	2,89 g
Kaliumphosphat, einbasisch (KH_2PO_4)	0,20 g
Wasser (5.2.2.2)	bis 1 000,0 ml

5.2.2.4 Neutralrot (1 : 1 000-Lösung)

Die Stammlösung wird aus 0,1 mg/ml Neutralrot (Sigma N7005³) in Wasser (5.2.2.2) hergestellt. Anschließend wird diese durch ein Filter mit der Porengröße 0,44 µm filtriert und bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

3 Sigma N 7005 ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

5.2.2.5 Fötale Kälberserum (FCS)

Das FCS muss zertifiziert frei von Viren und Mykoplasmen sein. Überflüssige Viren und Mykoplasmen können das Zell und Virenwachstum beeinflussen und zu falschen Ergebnissen führen.

Für RAW 264.7-Zellen ist ein spezielles FCS aufgrund der hohen Zellempfindlichkeit gegenüber Endotoxinen zu verwenden.

5.2.2.6 Trichloressigsäure (10%ige Lösung) (TCA)

10 g der TCA-Kristalle werden mit 80 ml Wasser (5.2.2.2) verdünnt, dann wird das Volumen auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt. Durch Umrühren wird die Lösung vervollständigt.

5.2.2.7 Wasser standardisierter Härte zur Verdünnung der Produkte

Die Vorgehensweise bei der Herstellung von 1 l Wasser standardisierter Härte ist wie folgt:

- Herstellung von Lösung A: 19,84 g Magnesiumchlorid (MgCl_2) und 46,24 g Calciumchlorid (CaCl_2) werden in Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.11) oder im Autoklaven [5.3.2.1 a)]. Sofern das Autoklavieren angewendet wird, kann dies zu einem Flüssigkeitsverlust führen. In diesem Fall wird die Lösung unter aseptischen Bedingungen mit Wasser (5.2.2.2) auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung im Kühlschrank (5.3.2.6) nicht länger als einen Monat lagern;
- Herstellung von Lösung B: 35,02 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) werden in Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird durch Membranfiltration (5.3.2.11) sterilisiert. Die Lösung im Kühlschrank (5.3.2.6) nicht länger als eine Woche lagern;
- 600 ml bis 700 ml Wasser (5.2.2.2) werden in einen 1 000ml-Messkolben gegeben, dazugegeben werden 6,0 ml (5.3.2.9) Lösung A und danach 8,0 ml Lösung B. Die erhaltene Lösung wird gemischt und mit Wasser auf 1 000 ml (5.2.2.2) aufgefüllt. Der pH-Wert (5.3.2.4) des Wassers standardisierter Härte muss $7,0 \pm 0,2$ betragen (5.3.2.4). Falls erforderlich, wird der pH-Wert mittels einer Lösung von etwa 40 g/l (etwa 1 mol/l) Natriumhydroxid (NaOH) oder etwa 36,5 g (etwa 1 mol/l) Salzsäure (HCl) eingestellt.

Das Wasser standardisierter Härte muss frisch unter aseptischen Bedingungen hergestellt und muss innerhalb von 12 h verbraucht werden.

ANMERKUNG Bei Herstellung der Produktprüflösungen (5.4.2) führt die Zugabe des Produkts zum Wasser standardisierter Härte zu einer unterschiedlichen endgültigen Wasserhärte in jedem Reagenzglas. In jedem Fall liegt die endgültige Wasserhärte, angegeben als Calciumcarbonat (CaCO_3), im Reagenzglas unter 375 mg/l.

5.2.2.8 Belastungssubstanz

5.2.2.8.1 Allgemeines

Die Belastungssubstanz muss nach den für das Produkt festgelegten Anwendungsbedingungen ausgewählt werden.

Die Belastungssubstanz muss steril sein und in einer Konzentration hergestellt werden, die dem 10-Fachen der in der Prüfung verwendeten Endkonzentration entspricht.

Die Ionenzusammensetzung (z. B. pH-Wert, Calcium und/oder Magnesiumhärte) und die chemische Zusammensetzung (z. B. Mineralstoffe, Proteine, Kohlenhydrate, Lipide und Detergentien) müssen festgelegt sein.

ANMERKUNG Der Begriff „Belastungssubstanz“ wird auch dann verwendet, wenn es sich um mehrere Substanzen handelt.

5.2.2.8.2 Bedingungen niedriger Belastung (Rinderserumalbumin — geringe Konzentration)

In 100 ml Wasser (5.2.2.2) Endvolumen werden 0,3 g Rinderserumalbumin Fraktion V (für mikrobiologische Zwecke geeignet) gelöst. Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration, die Lösung wird in einem Kühlschrank aufbewahrt und innerhalb eines Monats verbraucht.

Die Endkonzentration von Rinderserumalbumin (BSA) in der Prüfung beträgt 0,3 g BSA je Liter.

5.2.2.8.3 Bedingungen hoher Belastung (Rinderserumalbuminlösung — hohe Konzentration)

In 100 ml Wasser (5.2.2.2) Endvolumen werden 3,0 g Rinderserumalbumin Fraktion V (für mikrobiologische Zwecke geeignet) gelöst. Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration, die Lösung wird in einem Kühlschrank aufbewahrt und innerhalb eines Monats verbraucht.

Die Endkonzentration von Rinderserumalbumin (BSA) in der Prüfung beträgt 3 g BSA je Liter.

5.2.2.8.4 Milch (für Molkereibetriebe)

Magermilch, die garantiert frei von Antibiotika und Zusatzstoffen ist, muss wie folgt hergestellt werden:

- Es wird eine Lösung von 100 g Milchpulver in 1 000 ml Wasser (5.2.2.2) hergestellt.
- Es wird eine Lösung von 10,0 % (V/V) in Wasser (5.2.2.2) durch Zugabe von 10 Teilen rekonstituierter Milch zu 90 Teilen Wasser hergestellt. Es wird 30 min bei $(105 \pm 3)^\circ\text{C}$ [oder 5 min bei $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$] erhitzt.

Die Endkonzentration der rekonstituierten Milch in dem Prüfverfahren (5.5) beträgt 10,0 g/l.

Milch (entspricht 1,0 g/l des Milchpulvers).

5.2.2.9 Medium für Zellkulturen

Es muss Eagle's Minimum-Essential Medium (MEM) oder ein gleichwertiges Medium verwendet werden, ergänzt mit FCS (5.2.2.5), Antibiotika und weiteren Wachstumsfaktoren je nach Erfordernis.

- a) Ein *Wachstumsmedium* für die Zellvermehrung wird mit 10 % FCS ergänzt. Es werden 10 Teile FCS (5.2.2.5) zu 90 Teilen MEM gegeben.
- b) Ein *ErhaltungsmEDIUM*, um den Zellstoffwechsel ohne Stimulation des Zellwachstums aufrechtzuerhalten, wird mit 2 % FCS ergänzt. Es werden 2 Teile FCS (5.2.2.5) zu 98 Teilen MEM gegeben.

Andere Medien dürfen verwendet werden, wenn sie für die bestimmte Zelllinie geeignet sind.

Siehe auch Literaturhinweise [2]. Siehe EN 12353 für eine detaillierte Beschreibung.

5.2.2.10 Zellkulturen

Zellkulturen können als Einschicht-Zellkulturen oder in Suspensionen für Quantalversuche verwendet werden. Einschicht-Zellkulturen müssen vor der Beimpfung zu > 90 % zusammengewachsen (konfluierend) sein. Die Zellen für eine Virustitration müssen, wenn sie als Suspensionen in Quantalversuchen verwendet werden, den Verdünnungen des Prüfgemischs (5.5.2) in einer solchen Dichte hinzugefügt werden, dass die Bildung einer einschichtigen Lage innerhalb von höchstens 2 Tagen in der Zellkontrollprobe möglich ist.

Zelllinien werden entsprechend ihrer Sensibilität gegenüber den Prüforganismen (5.2.1) ausgewählt. Für weitere Details zu den Zelllinien siehe 5.5.1.1 e).

5.2.2.11 Referenz Glutaraldehyd (Glutaral, 1,5-Pentanedial) CAS-Nummer 111-30-8

Die geforderten chemischen und physikalischen Parameter zur Verwendung als Referenzstandard für die Prüfung von Desinfektionsmittelzubereitungen sind in Tabelle 2 festgelegt.

Tabelle 2 — Geforderte chemische und physikalische Parameter

Parameter	Festlegungen	
	50%ige Lösung	25%ige Lösung
Aussehen ^a	durchsichtige Flüssigkeit	durchsichtige Flüssigkeit
pH-Wert	3,1 bis 4,5	3,1 bis 4,5
Konzentration von Glutaraldehyd (durch Titration)	50,0 % bis 52,0 %	25,0 % bis 26,0 %
Stabilität (Umgebungsbedingungen)	12 Monate	12 Monate
^a Anmerkung: Eine gelbliche Farbe zeigt eine beginnende Polymerisierung an.		

Die vorstehend angegebenen Festlegungen (siehe Tabelle 2) sollten auf dem Analysenzertifikat überprüft werden. Die pH-Werte müssen regelmäßig vom Labor geprüft und bestätigt werden. Wenn der pH-Wert und/oder das Aussehen außerhalb der Festlegung liegen, kann das Glutaraldehyd nicht mehr verwendet werden.

5.3 Apparate und Glasgeräte

5.3.1 Allgemeines

Mit Ausnahme steril gelieferter sind alle Glasgeräte und alle Geräteteile, die mit den Kulturmedien und Reagenzien oder der Probe in Berührung kommen, nach einem der folgenden Verfahren zu sterilisieren:

- a) durch feuchte Hitze im Autoklaven [5.3.2.1 a)];
- b) durch trockene Hitze im Heißluftsterilisator [5.3.2.1 b)].

5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung⁴

Und insbesondere folgende Geräte:

5.3.2.1 Geräte zur Sterilisation (feuchte und trockene Hitze)

- a) zur Dampfsterilisation ein Autoklav, der für eine Mindesthaltezeit von 15 min bei $(121_0^{+3})^{\circ}\text{C}$ gehalten werden kann;
- b) zur Sterilisation durch trockene Hitze ein Heißluftsterilisator, der für eine Mindesthaltezeit von 30 min bei $(180_0^{+5})^{\circ}\text{C}$, für eine Mindesthaltezeit von 1 h bei $(170_0^{+5})^{\circ}\text{C}$ oder für eine Mindesthaltezeit von 2 h bei $(160_0^{+5})^{\circ}\text{C}$ gehalten werden kann.

5.3.2.2 Wasserbäder, einstellbar auf $(20 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ und zusätzliche Prüftemperaturen $\pm 1^{\circ}\text{C}$ (5.5.1).

5.3.2.3 Umkehr-Mikroskop zum mikroskopischen Betrachten der Zellkulturen.

5.3.2.4 pH-Messgerät, mit einer Kalibrierungsgenauigkeit von $\pm 0,1$ pH-Einheiten bei 20°C .

⁴ Sterile Einweggeräte sind eine annehmbare Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

5.3.2.5 Stoppuhr

5.3.2.6 Kühltank, einstellbar auf 2 °C bis 8 °C.

5.3.2.7 Elektromechanisches Rührwerk, z. B. Vortex[®]-Mischer⁵;

5.3.2.8 Behälter: Petrischalen, sterile Reagenzgläser, Kulturflaschen oder Kolben mit geeignetem Volumen.

5.3.2.9 Messkolben, kalibriert bei 20 °C.

5.3.2.10 Mikrotiterplatten oder Röhrchen, Petrischalen und Kolben für die Zellkulturen.

5.3.2.11 Membranfiltrationsgerät für die Filtration von Medien mit einer Porenweite von 0,22 µm.

5.3.2.12 CO₂-Brutschrank (95 % Luft, 5 % CO₂), einstellbar auf (36 ± 1) °C zur Inkubation von Zellkulturen. Ein Brutschrank einstellbar auf (37 ± 1) °C darf verwendet werden, wenn ein Brutschrank einstellbar auf (36 ± 1) °C nicht verfügbar ist.

5.3.2.13 Sterile Messpipetten mit Nennvolumina von 10 ml, 1 ml und 0,1 ml.

ANMERKUNG Kalibrierte automatische Pipetten können verwendet werden.

5.3.2.14 Magnetrührer, um die Zellen vor der Aussaat in Suspension zu halten.

5.3.2.15 Eismaschine oder kommerziell erhältliches Eis zum Kühlen des Zellerhaltungsmediums und der Reaktionsgemische während der Prüfung (siehe 5.5.2 und 5.5.4)

5.3.2.16 Becken als Eisbad mit Eis und Wasser.

5.3.2.17 Mechanisches Schüttelgerät

5.3.2.18 Zentrifuge

5.3.2.19 Biologische Sicherheitswerkbank der Klasse II.

5.3.2.20 Tiefkühleinrichtung, –70 °C oder weniger.

5.3.2.21 Exsikkator mit Vakuum-Manometer

5.3.2.22 Vakuum-Membranpumpe (z. B. Durchsatz von höchstens 3,8 m³/h Endvakuum < 75mbar)

5.3.2.23 Kryoröhrchen

5.3.3 Prüfoberflächen

Diese müssen Scheiben aus Edelstahl 1.4301 (EN 10088-1) mit einem Durchmesser von 2 cm sein, die beidseitig mit der Güteklasse 2 B beschichtet sind und den Anforderungen von EN 10088-2 entsprechen. Die Scheiben müssen so flach wie möglich sein; das wird am besten durch die Verwendung von nichtrostendem Stahl mit einer Dicke von 1,2 mm oder 1,5 mm erreicht. Die Scheiben dürfen nur mit einer Pinzette angefasst und nur einmal verwendet werden.

5 Vortex[®] ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

Vor der Verwendung müssen die Scheiben in einem Behälter mit einer angemessenen Menge von 5 Volumenprozent Decon 90[®] oder 1 Volumenprozent Blanisol-Pur⁶ für 60 min so gelagert werden, dass sie nicht zusammenkleben und die Oberfläche nicht beschädigt wird. Die Scheiben werden 10 s mit fließendem frisch destilliertem Wasser (5.2.2.2) oder entmineralisiertem Wasser abgespült; es wird vermieden, dass sie in jeglicher Form trocknen.

Die Scheiben werden weitere 10 s mit Wasser (5.2.2.2) gespült, um die vollständige Entfernung des Tensids sicherzustellen. Um einen ausreichenden Wasserfluss sicherzustellen, kann ein sterilisierter Flüssigkeitsdruckbehälter mit geeignetem Schlauch und Anschlussstück oder ein anderes geeignetes Verfahren angewendet werden, durch das eine Zufuhr von etwa 2 000 ml je min sichergestellt ist. Die Scheibe wird 15 min in ein Bad getaucht, das ISO-Propanol (IPA) enthält. Die Scheiben werden herausgenommen und mindestens 10 s mit Wasser (5.2.2.2) abgespült. Es wird durch Autoklavieren sterilisiert.

ANMERKUNG Geeignete Scheiben aus rostfreiem Stahl können üblicherweise von örtlichen Maschinenbaubetrieben käuflich erworben werden.

5.4 Herstellung der Prüforganismensuspensionen und der Produktprüflösungen

5.4.1 Prüforganismensuspensionen (Virusprüfsuspension)

Die Prüforganismen und deren Stammkulturen müssen nach EN 12353 hergestellt und aufbewahrt werden.

Die Virus-Stammsuspension wird in einer geeigneten Zelllinie, die hohe Titer von infektiösen Viren erzeugt, vermehrt. Die Zelltrümmer werden durch Zentrifugieren (400 g_N für 15 min) abgetrennt. Dieses Präparat wird als „Virusprüfsuspension“ bezeichnet.

Es wird vorgeschlagen, dass die Virussuspension einen Mindesttiter von 10^8 TCID₅₀/ml — bestimmt durch einen Quantalversuch [5.5.2 a)] oder durch einen Plaqueversuch [5.5.2 b)] — aufweist. In jedem Fall muss er hoch genug sein, um eine Titerabnahme um mindestens 4 lg Stufen zu ermöglichen, damit das Verfahren verifiziert werden kann.

Falls erforderlich, darf die Virussuspension durch geeignete Verfahren (z. B. Ultrazentrifugieren) konzentriert werden.

Die Prüfsuspension wird in kleinen Volumina unter -70 °C oder vorzugsweise zwischen -135 °C und -196 °C in der Dampfphase von flüssigem Stickstoff oder in flüssigem Stickstoff (mit geeigneten dichten Kryoröhrchen, 5.3.2.23) aufbewahrt.

Aus Sicherheitsgründen und — in einigen Fällen — zur Vermeidung einer möglichen Genmutation sind nur 10 Passagen aus dem ursprünglichen Aussaatvirus (z. B. Virus aus der Kulturensammlung) zulässig.

Die Prüfsuspension wird unverdünnt im Prüfverfahren (5.5.2 oder 5.5.3) verwendet.

5.4.2 Produktprüflösung

Genaue Informationen über das Produkt, wie es vom Hersteller oder aus einer anderen Quelle erhalten wurde, müssen aufgezeichnet werden.

Produktprüflösungen müssen in Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) in mindestens drei unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt werden, wobei eine Konzentration im wirksamen Bereich und eine Konzentration im unwirksamen Bereich liegen muss. Das Produkt im Lieferzustand darf als eine der Produktprüflösungen verwendet werden.

⁶ Decon 90[®] und Blanisol-Pur sind Beispiele für geeignete handelsübliche Produkte. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung der genannten Produkte durch CEN.

Verdünnungen gebrauchsfertiger Produkte, d. h. von Produkten, die bei ihrer Anwendung nicht verdünnt werden, müssen in Wasser (5.2.2.2) hergestellt werden.

Bei festen Produkten wird das Produkt im Lieferzustand gelöst, indem mindestens $1,0 \text{ g} \pm 10 \text{ mg}$ des Produkts in einen Messkolben eingewogen werden und mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) aufgefüllt wird. Die folgenden Verdünnungen (= niedrigeren Konzentrationen) müssen in Messkolben (5.3.2.9) auf der Basis von Volumenanteilen in Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) hergestellt werden.

Bei flüssigen Produkten müssen Verdünnungen des Produkts mit Wasser mit standardisierter Härte auf einer Volumen/Volumen-Basis unter Verwendung von Messkolben (5.3.2.9) hergestellt werden.

Die Produktprüflösungen müssen frisch hergestellt werden und müssen innerhalb von 2 h für die Prüfung verwendet werden. Sie müssen während des gesamten Prüfablaufs eine physikalisch homogene stabile Zubereitung ergeben. Falls während des Verfahrens eine sichtbare Inhomogenität durch das Eintreten einer Ausfällung oder Ausflockung auftritt, zum Beispiel durch die Zugabe der Belastungssubstanz, muss dies in den Prüfbericht aufgenommen werden.

Die im Prüfbericht angegebene Konzentration des Produkts muss der gewünschten Prüfkonzentration entsprechen. Die Prüfkonzentration ist als Konzentration Volumen je Volumen oder Masse je Volumen aufzuzeichnen wie auch die Einzelheiten der Produktprobe im Lieferzustand.

5.5 Verfahrensablauf zur Beurteilung der viruziden Wirkung des Produkts

5.5.1 Prüfbedingungen

Die Auswahl der Einwirkungstemperatur, der Einwirkzeit und der Belastungssubstanzen muss entsprechend der für das Produkt in Betracht gezogenen praktischen Anwendung (Abschnitt 4) wie folgt erfolgen:

a) Prüftemperatur θ , in °C:

Die Prüftemperatur muss Raumtemperatur sein (zwischen 18 °C und 25 °C); zusätzliche Temperaturen dürfen zwischen $(4 \pm 1) \text{ °C}$ und $(30 \pm 1) \text{ °C}$ gewählt werden und müssen im Prüfbericht (5.9) aufgezeichnet werden.

b) Einwirkzeit, t (in min):

Die zu prüfenden Einwirkzeiten sind in Abschnitt 4, Tabelle 1 festgelegt.

Die zulässige Grenzabweichung für jede gewählte Einwirkzeit beträgt $\pm 10 \text{ s}$, außer bei 1 min oder weniger, wo sie $\pm 5 \text{ s}$ beträgt.

c) Belastungssubstanzen:

Die zu prüfende Belastungssubstanz ist die Rinderalbuminlösung (5.2.2.8.2) unter Bedingungen niedriger Belastung oder unter Bedingungen hoher Belastung (5.2.2.8.3), entsprechend den praktischen Anwendungen.

Zusätzliche Belastungssubstanzen können entsprechend den spezifischen Anwendungsbereichen wie Milch (5.2.2.8.4) für Molkereibetriebe ausgewählt werden und müssen im Prüfbericht (5.9) aufgezeichnet werden.

d) Prüforganismen

Die zu prüfenden Prüftemperaturen sind in Abschnitt 4, Tabelle 1 festgelegt.

Zusätzliche Stämme dürfen ausgewählt werden und müssen im Prüfbericht vermerkt werden (5.9).

e) Zelllinie(n):

Adenovirus wird in HeLa- oder anderen Zelllinien mit einer geeigneten Sensibilität vermehrt.

Muriner Norovirus wird in RAW 264.7 (ATCC TIB-71) oder anderen Zelllinien mit einer geeigneten Sensibilität vermehrt.

Modifiziertes Vacciniavirus Ankara wird in BHK-21-Zellen (ATCC CCL-10) oder anderen Zelllinien mit einer geeigneten Sensibilität vermehrt.

5.5.2 Prüfverfahren

Die Prüfung muss bei einer Temperatur zwischen 18 °C und 25 °C durchgeführt werden. Jede Prüfoberfläche (5.3.3) wird aseptisch in eine Petrischale (5.3.2.8) gelegt, es wird sichergestellt, dass sich die Schale in einer horizontalen Position befindet.

Neun Volumina der Prüfvirus suspension (5.4.1) werden mit einem Volumen der Belastungssubstanzlösung (5.2.2.8) gemischt.

Für jeden Prüforganismus, für jede Konzentration des Produkts und für jede Kontaktzeit werden 2 Prüfoberflächen und 2 Prüfoberflächen für die Wasserkontrolle (5.5.6) vorbereitet. Die 2 Prüfoberflächen müssen in derselben Arbeitssitzung parallel angewendet werden. Die Prüfoberflächen werden in eine sterile Petrischale mit laminarer Luftströmung gelegt; es wird sichergestellt, dass sich die Schale in einer horizontalen Position befindet. Die Prüfoberflächen werden vorbereitet, indem jede Prüfoberfläche mit 50 µl der Virussuspension und die Belastungssubstanz beimpft wird, wobei darauf geachtet wird, dass die Suspension in der Mitte der Prüfoberfläche verteilt wird (5.3.3) (es wird vermieden, dass die Ränder der Prüfoberflächen berührt werden; die Suspension wird nicht verteilt). Die Oberflächen werden getrocknet, bis sie sichtbar trocken sind.

Es wird davon ausgegangen, dass die Trocknung der Prüfoberflächen aufgrund der Umgebungsbedingungen im Laboratorium und der Konstruktion der Kabine mit laminarer Luftströmung unterschiedlich schnell erfolgt. Aus diesem Grund wird keine Zeitdauer angegeben, und die Zeit, die die Oberflächen mindestens benötigen, um sichtbar trocken zu werden, sollte für jedes Laboratorium festgelegt sein. Die Trocknungszeit sollte 60 min nicht überschreiten; wenn sie überschritten wird, müssen andere Trocknungsbedingungen ausgewählt werden. Die Prüfoberflächen müssen sich bei der ausgewählten Prüftemperatur $\theta \pm 1$ °C ausgleichen.

Die Prüfoberflächen müssen innerhalb von 60 min verwendet werden, um eine Virusinaktivierung mit der Zeit zu verhindern.

Unmittelbar nach dem Trocknen wird jede Prüfoberfläche vorsichtig aufgehoben und mit der inokulierten Seite nach oben in eine sterile Petrischale gelegt; es wird sichergestellt, dass sich die Prüfoberfläche in einer horizontalen Position befindet. Das getrocknete Inokulum wird auf den Prüfoberflächen mit 100 µl der Prüflösung bedeckt. Es muss darauf geachtet werden, dass die Pipettenspitze den Träger nicht berührt. Für die Wasserkontrolle werden 100 µl Wasser mit standardisierter Härte (5.2.2.7) oder Wasser (5.2.2.2), wenn das Produkt in Wasser verdünnt wurde, auf die anderen Prüfoberflächen aufgebracht, wobei sichergestellt wird, dass das getrocknete Inokulum vollständig bedeckt ist.

Nach der gewählten Einwirkzeit wird jede der Prüfoberflächen sofort in einen getrennten Behälter (mit flachem Boden zwischen 4 cm und 5 cm, mit Deckel) überführt und 0,9 ml eisgekühltes Medium für Zellkulturen ohne FCS, z. B. Eagle's minimal essential medium (EMEM) oder Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), je nach verwendeter Zelllinie zugegeben. Jeder Behälter wird 60 s (5.3.2.7) (oder so lange, bis kein getrocknetes Inokulum mehr sichtbar ist) gemischt, um das Virus zu resuspendieren.

Unmittelbar nach der Elution wird eine Reihe von zehnfachen Verdünnungen der Virussuspension in eiskaltem Erhaltungsmedium (MEM + 2 % FCS) hergestellt. Die Pipettenspitzen müssen nach jeder Verdünnung gewechselt werden, um ein Verschleppen von Viren zu vermeiden.

Die Zellkulturen werden mit den Verdünnungen beimpft. Nach dem Bebrüten wird der Virustiter bestimmt.

Die Reduktion des Virustiters wird aus den Titerdifferenzen zwischen den mit Desinfektionsmittel und den mit Wasser mit standardisierter Härte behandelten Proben berechnet.

Nach der Behandlung mit dem Produkt oder Wasser wird die Infektiosität mit einem der folgenden Verfahren geprüft.

a) Quantalversuche (Endpunkttitration) — [die Verfahren 1) bis 2) sind alternativ anzuwenden]

1) Virustitration auf Zellen in Suspension auf Mikrotiterplatten:

0,1 ml jeder Verdünnung werden, beginnend mit der höchsten Verdünnung, in sechs oder acht Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (5.3.2.10) übertragen. 0,1 ml einer Zellkultursuspension (5.2.2.11) wird in einer solchen Dichte hinzugefügt, dass die Bildung einer einschichtigen Zellschicht (> 90 %) nicht länger als 2 Tage in der Zellkontrollprobe möglich ist. Parallel dazu dienen sechs oder acht Vertiefungen als Zellkontrollprobe und erhalten keine Virussuspension.

Die zytopathische Wirkung (CPE) des Virus wird nach der geeigneten Bebrütungszeit (entsprechend dem Virustyp) mittels eines Umkehr-Mikroskops beurteilt.

2) Virustitration auf einschichtigen Zellschichten auf Mikrotiterplatten:

0,1 ml jeder Verdünnung wird in sechs bis acht Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (5.3.2.10) übertragen, die eine konfluierende (> 90 %) einschichtige Zellschicht (5.2.2.11) ohne Medium enthalten. In die letzte Reihe von sechs oder acht Vertiefungen wird 0,1 ml Kulturmedium (5.2.2.10 b)) gegeben, sie dient als Zellkontrollprobe. Nach einer Bebrütungszeit von 1 h bei 37 °C wird jeder Vertiefung 0,1 ml Zellkulturmedium (5.2.2.10 a)) zugesetzt. Die Pipetten für die Röhrchen oder Vertiefungen sind auswechseln, wenn Medium zugesetzt wird.

Die zytopathische Wirkung (CPE) des Virus wird nach der geeigneten Bebrütungszeit (entsprechend dem Virustyp) mittels eines Umkehr-Mikroskops beurteilt.

b) Plaqueversuche

Vertiefungen in Untersuchungstabletts aus Kunststoff (Oberflächendurchmesser 30 mm bis 35 mm) mit konfluierenden einschichtigen Zellschichten werden einmal mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) (5.2.2.3) gewaschen und mit jeweils 0,2 ml der Verdünnungsreihen der Viren in MEM + 2 % FCS beimpft. Im Allgemeinen werden sechs bis acht Vertiefungen je Verdünnung verwendet. Nach einer Adsorptionsdauer von 1 h bei 37 °C, in der die Einschicht-Zellschichten durch Neigen der Platten alle 8 min bis 10 min feucht gehalten werden, wird das Inokulum entfernt und die Zellschichten werden einmal mit PBS gewaschen. Anschließend werden die Vertiefungen mit 3 ml eines Gemischs aus 2 % verflüssigter Agarose oder einem sonstigen geeigneten halbfesten Medium und doppelt konzentriertem MEM mit 4 % FCS überschichtet. Die Kulturen werden für 5 Tage bis 6 Tage bei 37 °C in einem CO₂-Brutschrank (5.3.2.12) bebrütet.

Die Plaques können nach Zusatz von 2 ml einer zweiten Überschichtung mit der gleichen Zusammensetzung wie die erste, die ebenfalls 5 % Neutralrotlösung 1 : 1 000 enthält, und weiterer Bebrütung (im Dunkeln) bei 37 °C für 24 h bis 48 h in einem CO₂-Brutschrank (5.3.2.12) ausgezählt werden.

Die Auszählung kann auch nach Zugabe von Kristallviolett erfolgen. Die Einschicht-Zellkulturen werden durch Zugabe von 2 ml Trichloressigsäure (TCA) 10 % (5.2.2.6) über die Agarüberschichtung für 10 min bis 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Die Agarüberschichtung wird dann entfernt und 2 ml Kristallviolett 0,1 % in 20%igem Ethanol werden zugegeben. Nach 10 min bis 15 min bei Raumtemperatur werden die Vertiefungen ausgiebig mit Wasser gespült und die Plaques (weiße Flecken) werden ausgezählt.

ANMERKUNG Als Alternative zum Plaqueversuch kann die Bestimmung mit CPE verwendet werden.

In außergewöhnlichen Fällen (z. B. zu geringes Volumen der Virusprüfsuspension) können kleinere Volumen der Reagenzien und des Virus verwendet werden, wobei sicherzustellen ist, dass die relativen Proportionen aufrechterhalten werden.

5.5.3 Durch Produktlösungen verursachte Zytotoxizität

5.5.3.1 Zytotoxische Wirkung

Zur Überprüfung einer möglichen morphologischen Veränderung der Zellstrukturen durch das Desinfektionsmittel werden 45 µl MEM + 2 % FCS + 5 µl Belastungssubstanz gemischt und ein Keimträger damit beimpft und getrocknet. 100 µl des Produkts (in den in der Prüfung verwendeten Verdünnungen) werden zugegeben und 5 min bei Prüftemperatur stehen gelassen. 0,9 ml MEM und 2 % FCS-Gemisch (5.3.2.7) werden 30 s eluiert. Verdünnungsreihen (Verdünnungsschritt: 1 : 10) werden im Kulturmedium hergestellt und in Zellkulturen (einschichtige Zellschichten oder suspendierte Zellen) beimpft. Dies muss parallel zur Prüfung durchgeführt werden. Jegliche mikroskopische Veränderungen in den Zellen werden beim Ablesen der Prüfungen für CPE (2 Prüfoberflächen) aufgezeichnet.

5.5.3.2 Interferenzkontrolle — Kontrolle der Zellsensibilität

Ziel der Interferenzkontrolle ist festzustellen, ob die Zellsensibilität für die Virusinfektion durch die Behandlung mit dem Desinfektionsmittel nicht negativ beeinflusst wird.

Vergleichende Virustitrationen werden an Zellen durchgeführt, die mit und ohne Desinfektionsmittel behandelt wurden, um die Verminderung der Sensibilität gegenüber Viren wie folgt zu bestimmen:

Behandlung der Zellen:

- a) Einschicht-Zellkulturen: 0,1 ml der niedrigsten, offenbar nicht zytotoxischen Verdünnung (keine mikroskopisch erkennbare Veränderung) der Produktlösung (5.4.2) oder PBS (5.2.2.3) und 0,1 ml des Kulturmediums werden auf jede der 6 dargestellten Zellkulturen auf Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (5.3.2.10) aufgetragen; nach Einwirkung für 1 h bei 37 °C wird der Überstand verworfen;
- b) Zellsuspensionen: ein Volumen der niedrigsten, offenbar nicht zytotoxischen Verdünnung des Produkts oder PBS (5.2.2.3) wird einem Volumen doppelt konzentrierter Zellsuspension zugegeben. Nach 1 h bei 37 °C werden die Zellen abzentrifugiert und in Kulturmedium [5.2.2.10 a)] resuspendiert.

Vergleichende Virustitration:

Das Virus wird von 10^{-1} bis 10^{-10} verdünnt und auf den behandelten oder unbehandelten Zellen parallel zu 5.5.2 a) oder b) titriert.

Zur Bestimmung einer verbleibenden Infektiosität können nur die Verdünnungen der Produktlösung verwendet werden, die

- a) einen niedrigen Grad der Zellzerstörung (< 25 % der Einschicht-Zellkultur) aufweisen;
- b) eine Reduktion des Virentiters um < 1 lg hervorrufen.

5.5.3.3 Elimination der Zytotoxizität

Falls die Zytotoxizität so stark ist, dass die Reduktion (5.8.2) der verbleibenden Infektiosität kleiner als die geforderten 4 lg TCID₅₀ ist und deshalb eine 4 lg-Reduktion nicht bestimmt werden kann, müssen spezielle Techniken verwendet werden, wie z. B.:

- a) Molekularsiebfiltration, d. h. Sephadex™ LH 20¹ (A.1);